

肿瘤坏死因子 α 对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1表达及转录调控的影响

李晓冬, 朱广瑾, 王 雯, 祖淑玉

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院, 北京市 100005)

[关键词] 病理学; 肿瘤坏死因子 α 对内皮细胞的作用; 基因重组; 纤溶酶原激活物抑制剂1; 基因表达; AP-1元件; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨肿瘤坏死因子 α 对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1活性和mRNA表达的影响, 以及纤溶酶原激活物抑制剂1基因5'上游序列的调控元件在该基因转录调控中的作用。体外培养人脐静脉内皮细胞, 加入不同浓度肿瘤坏死因子 α 作用不同时间。采用发色底物法测定纤溶酶原激活物抑制剂1活性, Northern印迹分析法测定纤溶酶原激活物抑制剂1 mRNA水平。基因重组技术构建四个含人纤溶酶原激活物抑制剂1基因不同长度5'上游序列的荧光素酶报告基因质粒, 瞬时转染进入内皮细胞, 并测定荧光素酶的表达情况。运用聚合酶链反应和序列分析法对构建质粒上的三个AP-1元件分别进行定点突变。结果发现, 不同浓度肿瘤坏死因子 α 作用人脐静脉内皮细胞后, 纤溶酶原激活物抑制剂1活性和mRNA表达量均明显增高; 当转染质粒含有纤溶酶原激活物抑制剂1基因上游序列-1509/+90和-823/+90时, 肿瘤坏死因子 α 使转染细胞的荧光素酶表达量比对照组明显增高; 当转染质粒含有-553/+90和-47/+90时, 肿瘤坏死因子 α 的诱导作用不明显。在纤溶酶原激活物抑制剂1 5'上游序列的三个AP-1元件突变后, 肿瘤坏死因子 α 的诱导作用明显降低。结果提示, 肿瘤坏死因子 α 增强血管内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1活性与mRNA表达; 纤溶酶原激活物抑制剂1活性提高与其mRNA表达增加呈正相关; 纤溶酶原激活物抑制剂1 5'上游序列中三个AP-1元件在肿瘤坏死因子 α 对纤溶酶原激活物抑制剂1诱导中具有重要调控作用。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effects of Tumor Necrosis Factor α on Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression and Regulation in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

LI Xiao-Dong, ZHU Guang-Jin, WANG Wen, and ZU Shu-Yu

(Department of Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] Plasminogen Activator Inhibitor 1; Gene Expression; AP-1 Element; Atherosclerosis; Tumor Necrosis Factor α ; Human Umbilical Vein Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To study the influence of tumor necrosis factor α (TNF α) on plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity, gene expression and regulation in human umbilical vein endothelial cell (hUVEC). **Methods** The PAI-1 activity in hUVEC culture medium was measured by chromogenic assay. The PAI-1 mRNA expression were determined by Northern blot.

Using gene recombination techniques, four luciferase reporter gene plasmids containing different length of human PAI-1 gene promoter were constructed. Through the transient transfection analysis, the roles of AP-1 element (from -823 bp to -553 bp) in PAI-1 promoter have been determined. In order to further verify the role of AP-1 element, the three site-directed mutants were received using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing assay. **Results** The PAI-1 activity and mRNA level increased when hUVEC were exposed to 100 ng/L TNF α . At the same time, the AP-1 protein level increased in nuclear. The induction by TNF α decreased markedly when the three AP-1 elements in PAI-1 promoter have been mutated respectively.

Conclusions TNF α could induce PAI-1 activity and mRNA in hUVEC; Increase of PAI-1 activity induced by TNF α was related to its mRNA expression; Three AP-1 elements in PAI-1 promoter may have an important role in PAI-1 gene transcriptions in endothelial cells induced by TNF α .

[收稿日期] 2002-10-18 [修回日期] 2003-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(39730220)资助

[作者简介] 李晓冬,男,1973年出生,黑龙江省伊春市人,博士,现在美国加州大学圣地亚哥分校从事博士后工作。E-mail: xiaodong777@hotmail.com。朱广瑾,女,1942年出生,上海市人,研究员,博士研究生导师,主要研究方向为高血压、动脉粥样硬化发病,内皮细胞功能、转录调控异常机制与防治。本文的通讯联系人。王雯,女,1972年出生,山东省烟台市人,讲师,博士研究生。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)严重危害人类健康和生命,其发病机理与内皮细胞功能障碍关系密切^[1]。As也是一类炎症性疾病。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF α)为一种炎症细胞因子,在高血脂、高血压及As患者体内明显增高,它在动脉粥样斑块中阳性率高达90%,且与As的严重

程度成正比^[2],表明 TNF α 与 As 有密切联系,是 As 发生的重要危险因素。

纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)的生理性抑制剂,调节纤溶系统活性。目前认为,血管内皮损伤、血浆 PAI-1 增多是 As 等血管、血栓性疾病发生的主要原因之一^[2,3],血管内皮细胞是血浆 PAI-1 产生的主要场所^[4,5]。多种 As 危险因素如氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)^[6]、TNF α ^[7]等都能增加血管内皮细胞 PAI-1 表达。近年来,有关 PAI-1 基因表达机制的研究已经开展,但其确切机制尚未阐明。本研究旨在探讨 TNF α 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) PAI-1 活性和 mRNA 表达的影响,以及 PAI-1 基因 5' 上游序列的调控元件在该基因转录调控中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

胎牛血清(FCS)购于 hyclone 公司。iv 型胶原酶、探针标记试剂盒购于 Sigma 公司。Lipofectamine 转染试剂、M199 培养基、胰蛋白酶和 HEPES 为 Gibco 公司产品。含人 PAI-1 cDNA 片段的 PUC 重组质粒由荷兰 Van Hinsbergh 博士惠赠。TNF α 购自北京邦定公司。PAI-1 活性测定试剂盒购于上海医科大学生物化学一分子遗传室。TEM-Easy Vector 和 Luciferase 测定试剂盒购于 Promega 公司。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 购于北京亚辉生物医学工程公司。AP-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 购自 Immunotech 公司。NCIP/NBT 为北京鼎国生物技术公司产品。酶标仪为 Lab system 公司产品。荧光分析仪(Monolight 2010 型)为 Analytical Luminescence Lab 产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定^[8,9]

取健康产妇的婴儿脐带,用无菌 PBS 反复冲洗脐静脉管腔内污血,排空脐静脉,注入 37℃预温的 0.1% iv 型胶原酶 10 mL, 37℃温浴 20~30 min。收集消化液,用 PBS 反复冲洗脐静脉管腔,同消化液一并室温离心 10 min (1000 r/min)。弃上清,用完全 M199 培养基(含不完全 M199 培养基 80%,胎牛血清 20%, ECGF 20 mg/L, 谷氨酰胺 2 mmol/L, 肝素钠 50 mg/L)重新悬浮细胞。台盼兰拒染法测定细胞存活率 > 95%, 并进行细胞计数。以 $10^7 \sim 10^8$ 个/L 接种到 25 cm² 的培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱

中进行培养。倒置显微镜下见细胞呈多角形排列。用 (I)因子相关抗原免疫组织化学方法进行 hUVEC 鉴定。用消化液(0.125% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA)消化传代,传至 2~3 代后用于实验。

1.3 发色底物法测定纤溶酶原激活物抑制剂 1 的活性

细胞传至 2~3 代后,接种到 96 孔板中,生长至 90% 汇合。用不含血清的 M199 培养基清洗 2~3 次,加入含 TNF α 的条件培养基(含 5% 胎牛血清),同时设对照组。100 ku/L TNF α 不同作用时间组(分别刺激细胞 6、12、18 及 24 h)及 TNF α 不同作用浓度组(浓度分别为 0、50、100、200 及 400 ku/L),作用时间均为 12 h。离心培养基(4℃, 1 000 r/min, 5 s),取上清,按试剂盒操作说明测定 PAI-1 活性,PAI-1 活性用 kAU/L 表示(PAI-1 活性单位定义为:在 25℃、20 min 内抑制 1.0 国际单位 t-PA 的 PAI-1 酶量即为 1.0 AU)。

1.4 Northern blot 测定纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因 mRNA 水平

内切酶 EcoR iv 对含人 PAI-1 cDNA 片段的 PUC 重组质粒进行酶切,回收 PAI-1 cDNA 片段。同时,以人基因组为模板,用 PCR 法扩增获得用作内对照探针的 β -actin 片段。按标记试剂盒操作说明,用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记探针。培养内皮细胞数达 1×10^8 时弃去培养基,更换条件培养基,操作同前。用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA,所得 RNA 溶解于 0.5% SDS。测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 之间,甲醛凝胶电泳见 28 S 与 18 S 区带清晰集中。取总 RNA 20 μ g,溶于 20 μ L 上样缓冲液。65℃温育 15 min,冰浴 5 min,1% 甲醛凝胶电泳分离。用虹吸印迹法将凝胶上的 RNA 转至尼龙膜上。80℃烤膜 2 h。预杂交、杂交、洗膜、放射自显影。用吸光度扫描仪测定吸光度,比较目的片段和内对照组吸光度比值。

1.5 Western blot 测定 AP-1 蛋白水平

参照《分子克隆实验指南》,提取内皮细胞核蛋白,用 Lowry 法进行核蛋白定量。用 12% SDS-PAGE 分离胶对蛋白进行电泳分离,电转入 PVDF 膜。用 AP-1 抗体杂交,采用碱性磷酸酶显色。

1.6 含纤溶酶原激活物抑制剂 1 5' 端上游序列荧光素酶报告基因质粒的构建

上游引物: PAI-1 - 1509/+ 90 bp: GGTACCG-TACTGGTCCATAGCCTGTTA; PAI-1 - 823/+ 90 bp: GGTACCGTCTCCTGTTTCCTTACCAAGC; PAI-1 - 553/+ 90 bp: GGTACCTGCATGCCCTGTGGCTGT; PAI-1 - 47/+ 90 bp: GGTACCATTTCCTGCCCCACATCTGGTA; 共

同下游引物为: AGATCTGCTGAGCTGCAGGAATT CAGCTG。以基因组 DNA 为模板, 获得不同长度的 PAF-1 基因 5' 上游序列。连于 pGEM T-Easy Vector 后, 经 Kpn IV 和 Bgl Ⅱ 双酶切获得粘性末端, 连于表达载体 pGL3-Basic Vector 中, 酶切和测序鉴定。

1.7 报告基因质粒转染真核细胞

转染前细胞常规传代, 以细胞量 $3 \times 10^5/35$ mm 直径培养皿接种。当细胞生长至 80% ~ 90% 汇合时, 用转染试剂 lipofectamine 将构建质粒和内对照质粒 β -Gal 转入内皮细胞。置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 7 h 后, 更换完全培养基继续培养 36 h, 更换含 TNF α 的条件培养基(含 5% 胎牛血清), 作用转染的内皮细胞一定时间。

1.8 转染内皮细胞的裂解和荧光素酶活性测定

按 Promega 公司推荐的标准程序进行: 弃培养基, 裂解细胞并测定荧光素酶活性。取 20 μ L 细胞裂解液加至荧光测定管中, 加入 100 μ L 荧光素酶反应底物, 在 Monolight 2010 荧光分析仪上测定荧光强度, 测定时间为 20 s。

1.9 AP-1 调控元件定点突变序列荧光素酶报告基因质粒的构建

根据文献[10]报道的 PAF-1 基因 5' 上游 1.6 kb 序列和各顺式元件的位置, 借助 DNA 分析软件设计引物设计三对导入突变引物, 同时还采用 PAF-1-823/+90 片段两端引物, 引物序列分别为: pGL3-PAF-1-AP-1A-MU: Primer 1: CAAAGAGAGCCCTCAG GGGCACAGAGAGAGTCTGGACAC, Primer 2: CCCCT GAGGGCTCTCTTTGGTCAACAACCTTGTCTGGCT; pGL3-PAF-1-AP-1B-MU: Primer 1: CCGTGTAGAATCGGA GGCGGCCGGGCACATG, Primer 2: CCGCCTCC GATTC-TACACGGCTGACTCCCCAC; pGL3-PAF-1-AP-1G-MU: Primer 1: CATCAGTGAATCTATTTCTGCCACATCTG G, Primer 2: GGAAATAGATTCACTCATGTTCCAGCCT CACCC; 公用引物: Upper primer: GGTACCGTCTCCT-GTTTCCTTACCAAGC, Lower primer: AGATCTGCT-GAGCTGCAGGAATTCAGCTG。分别以各自突变引物和公用引物两两结合, 以质粒 pGL3-PAF-1-823/+90 为模板, 经三次 PCR 反应, 获得含有突变位点的 DNA 序列。与质粒构建流程相似, 分别将 DNA 片段 pGEM T-Easy Vector 经酶切鉴定, 测序分析后, 最终获得含有突变位点的荧光素酶报告基因质粒。转染入 hUVEC 中, 测定 TNF α 作用后的荧光素酶活性变化, 方法同上。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子 α 对纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性的影响

100 ku/L TNF α 分别作用血管内皮细胞 12、18 及 24 h, PAF-1 活性与对照组比较均有明显增高 ($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。分别以 50、100、200 及 400 ku/L TNF α 刺激血管内皮细胞 12 h, PAF-1 活性与对照组比较均有明显增高 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

表 1. 同一浓度肿瘤坏死因子 α 作用不同时间对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性的影响

Table 1. Effects of various time of TNF α (100 ku/L) on activity of hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$, kAU/L)

时 间	对照组	实验组
6 h	2.08 \pm 0.89	3.35 \pm 0.53
12 h	2.98 \pm 1.15	10.93 \pm 0.87 ^a
18 h	3.55 \pm 1.5	12.50 \pm 0.51 ^a
24 h	3.50 \pm 2.54	10.67 \pm 0.92 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 不同浓度肿瘤坏死因子 α 对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性的影响

Table 2 Effects of various concentration of TNF α on PAF-1 activity of hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$, kAU/L)

浓度 (ku/L)	活 性
0	2.66 \pm 0.57
50	7.50 \pm 0.88 ^a
100	9.61 \pm 1.63 ^a
200	8.38 \pm 0.66 ^a
400	6.99 \pm 1.00 ^a

a: $P < 0.01$. 与 0 ku/L TNF α 比较。

2.2 肿瘤坏死因子 α 对纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因 mRNA 表达的影响

Northern 印迹杂交后, 放射自显影图像经吸光度扫描显示, TNF α (100 ku/L) 作用血管内皮细胞 8 h, PAF-1 mRNA 表达 (PAF-1/ β -actin 为 1.50) 是对照组 (PAF-1/ β -actin 为 0.52) 的 2.88 倍。

2.3 肿瘤坏死因子 α 对 AP-1 蛋白表达的影响

Western blot 杂交结果发现, TNF α 作用细胞 0.5 h 后, 核内转录因子 AP-1 含量增加。TNF α 作用细胞 1.5 h 后, AP-1 表达基本恢复至正常(表 3, Table 3)。

表 3. 肿瘤坏死因子 α 对 AP-1 蛋白表达的影响Table 3. Effect of TNF α on AP-1 protein level in hUVEC

分 组	0.5 h	1.5 h
对照组	24459	23427
肿瘤坏死因子 α 组	83611	22914

2.4 纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因 5' 上游不同长度序列在肿瘤坏死因子 α 诱导纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因转录中的作用

瞬时转染分析结果发现, 含有 PAI-1 基因上游序列 -1509/+90 bp 和 -823/+90 bp 的质粒转染细胞后, TNF α 可使其荧光素酶表达量较对照组明显增加。但当转染质粒含有 -553/+90 bp 和 -47/+90 bp 时, 转染细胞的荧光素酶表达量显著降低(表 4, Table 4)。

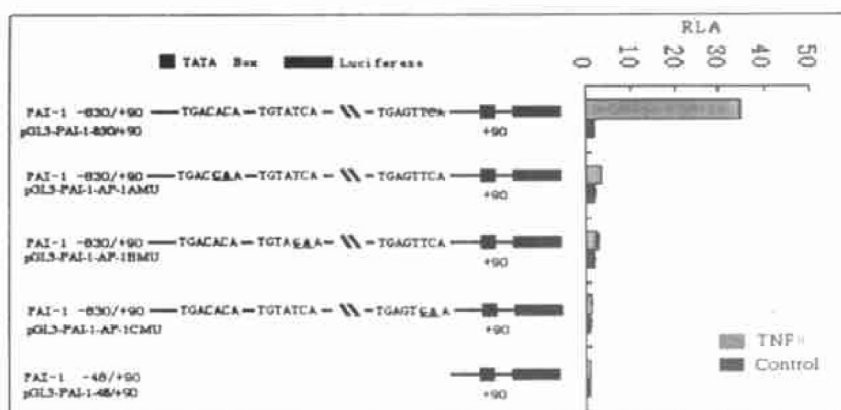
2.5 AP-1 顺式作用元件在肿瘤坏死因子 α 诱导纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因转录中的作用

运用 PCR 方法, 对已构建质粒 pGL3-PAI-1-823/+90 上三个 AP-1 顺式元件分别进行定点突变, 即将 -721 bp 到 -714 bp 处 AP-1 位点 5'-TGACACA-3' 置换成 5'-TGACCAA-3'、-662 bp 到 -656 bp

处 AP-1 位点 5'-TGTATCA-3' 置换成 5'-TGAGGAA-3' 和 -58 bp 到 -50 bp 处 AP-1 位点 5'-TGAGITCA-3' 置换成 5'-TGAGTGAA-3', 获得三个突变体, 分别命名为 pGL3-PAI-1-AP-1AMU、pGL3-PAI-1-AP-1BMU 和 pGL3-PAI-1-AP-1CMU。再经核苷酸序列分析, 确定重组质粒插入片段中含有突变的 AP-1 位点。与野生型质粒 pGL3-PAI-1-823/+90 分别转入内皮细胞后, TNF α 对三个质粒突变体的荧光素酶诱导作用明显下降(图 1, Figure 1)。

表 4. 纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因 5' 上游不同长度序列在肿瘤坏死因子 α 诱导纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因转录中的作用Table 4. Effect of nested 5' deletional mutants in PAI-1 promoter sequence on luciferase expression induced by TNF α (100 ku/L, 12 h)

基因序列	对照组	实验组
pGL3-PAI-1-1509/+90	3.6	26.35
pGL3-PAI-1-823/+90	3.74	25.13
pGL3-PAI-1-553/+90	2.06	3.75
pGL3-PAI-1-47/+90	1	1

图 1. AP-1 顺式作用元件定点突变在肿瘤坏死因子 α (100 μ g/L, 12 h) 诱导人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因转录中的作用Figure 1. Effect of site directed mutants of AP-1 in promoter on luciferase expression induced by TNF α (100 μ g/L, 12 h) in hUVEC

3 讨论

本文研究 As 发病中内皮细胞功能紊乱对 PAI-1 表达的影响及其转录调控机制, 选用 hUVEC 作为靶细胞。脐静脉内流淌着含氧量丰富的动脉血, 其内皮细胞功能特性接近于动脉内皮细胞, 并且直接来自人体, 是研究血管内皮细胞功能紊乱、参与 As 发病机制的理想细胞模型。实验选用 2~3 代 hUVEC 作为材料, 并根据内皮细胞形态及其特异表达 (11)因

子相关抗原的特点, 采用形态学观察和免疫组织化学染色方法进行鉴定。

实验采用炎症细胞因子 TNF α 作为刺激因素, 并遴选了 TNF α 作用于体外培养 hUVEC 的浓度和时间条件。结果表明, 在观察的浓度范围内, TNF α 明显增高 hUVEC PAI-1 活性, 100 μ g/L TNF α 作用 12 h 为最佳时间。说明在 TNF α 作用下内皮细胞表达 PAI-1 增高可能是 As 或高血压疾患出现血液高凝现

象的原因之一。本文采用 Northern Blot 杂交实验测定 TNF α 作用细胞前后 PAI-1 mRNA 水平的变化, 结果发现, TNF α 能明显增加 hUVEC PAI-1 mRNA 表达, 提示在 TNF α 作用下, PAI-1 活性增加是由于 hUVEC 转录 PAI-1 基因增强, 致使 PAI-1 蛋白合成增多所致。

纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 基因 5' 端启动子区含有 AP-1、SP-1 等多个顺式作用元件, 这些元件能通过与反式作用因子结合而调节 PAI-1 的表达。当前, AP-1 在 PAI-1 基因表达中的作用引起人们的关注。人 PAI-1 基因 5' 上游存在两个 AP-1 顺式作用元件, 在 TGF β 、PMA 和血清诱导细胞 PAI-1 基因转录具有重要作用^[11-13]。本研究实验结果发现, TNF α 可促使质粒 pGL3-PAI-1-1509/+90 和 pGL3-PAI-1-823/+90 表达荧光素酶, 而对 pGL3-PAI-1-553/+90、pGL3-PAI-1-47/+90 无明显作用, 提示在启动子-1509 bp 到+553 bp 的序列中存在着在 TNF α 影响 PAI-1 表达中起调节作用的序列。据报道在人 PAI-1 基因 5' 上游调控区-553 bp 到-823 bp 处存在两个 AP-1 顺式作用元件 TGACACA (-721 bp 到-714 bp) 和 TGTATCA (-662 bp 到-656 bp)。为证实参与 TNF α 诱导反应就是这两个 AP-1 元件, 本研究以荧光素酶质粒 pGL3-PAI-1-823/+90 为模板, 对这两个 AP-1 元件分别进行定点突变, 使之结构发生改变而失去与 fos/jun 结合的功能。另据文献[14]报道, 距起始位点-58 bp 到-50 bp 处的另一 AP-1 顺式作用元件(TGAGTTCA) 也具有重要的调节功能, 为确证此元件在本研究中的作用, 同时构建了相应的质粒突变体。结果发现, mmLDL 对 AP-1 元件发生突变的质粒荧光素酶诱导作用明显减弱, 说明-823 bp 到-553 bp 之间的 AP-1 元件确实在 TNF α 对 PAI-1 基因的诱导反应中起有调控转录的作用。当-58 bp 到-50 bp 处的 AP-1 元件被突变后, 对 TNF α 诱导反应也明显降低, 说明了该元件在 TNF α 对 PAI-1 基因的诱导反应中可能也具有重要作用。

基因转录调控机制相当复杂, 常常需要多种顺式作用元件、反式作用因子参与。除 AP-1 作用元件外, 在 PAI-1 基因 5' 上游序列还存在多个 SP-1 元件、AP-2 和 NF-1 等多种元件, 参与 TGF β 、PMA、葡萄糖、胰岛素等对该基因的诱导作用^[15-17]。欲弄清

PAI-1 基因表达调控的机制, 还需要进行大量的实验工作。

[参考文献]

- [1] Mehta JL, Li DY. Identification and autoregulation of receptor for ox-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **248** (3): 511-514
- [2] Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol*, 1990, **65** (5): 297-302
- [3] 沈涛, 白怀, 刘秉文, 张祖辉. 实验性高甘油三酯血症大鼠凝血和纤溶的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 199-202
- [4] 阮秋蓉, 宋建新, 邓仲端, 翟智玲, 倪娟. 山莨菪碱下行调节培养的内皮细胞表达纤溶酶原激活物抑制剂 1. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 194-197
- [5] Kooistra T, van den Berg J, Tons A, Platenburg G, Rijken DC, van den Berg E. Butyrate stimulates tissue-type plasminogen activator synthesis in cultured human endothelial cells. *Biochem J*, 1987, **247** (3): 605-612
- [6] Ren S, Man RY, Angel A, Shen GX. Oxidative modification enhances lipoprotein (a)-induced overproduction of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 1997, **128** (1): 1-10
- [7] Nienhala MJ, Steir-Picarella M. Role of protein kinase C in tumor necrosis factor induction of endothelial cell urokinase-type plasminogen activator. *Blood*, 1993, **81** (10): 2608-617
- [8] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2745-756
- [9] Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of antithrombotic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2757-764
- [10] Bosma PJ, Avanderberg E, Kooistra T. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Bio Chem*, 1988, **263** (19): 9129-141
- [11] Kutz SM, Hordines J, McKeown-Longo PJ, Higgins PJ. TGF-beta 1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci*, 2001, **114** (Pt 21): 3905-914
- [12] Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, et al. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 1987, **49** (6): 729-739
- [13] Dong G, Schulick AH, DeYoung MB, Dichek DA. Identification of a cis-acting sequence in the human plasminogen activator inhibitor-1 gene that mediates transforming growth factor-beta responsiveness in endothelium in vivo. *J Bio Chem*, 1996, **271** (47): 29969-977
- [14] Arts J, Grimbergen J, Bosma PJ, Rahmsdorf HJ, Kooistra T. Role of c-Jun and proximal phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-responsive elements in the regulation of basal and PMA-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in Hep G2. *Eur J Bio Chem*, 1996, **241** (2): 393-402
- [15] Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes*, 2001, **50** (7): 1522-530
- [16] Ding H, Descheemaeker K, Marynen P, Nelles L, Carvalho T, Camar-Fonseca M, et al. Characterization of a helicase-like transcription factor involved in the expression of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *DNA Cell Bio*, 1996, **15** (6): 429-442
- [17] Descheemaeker KA, Wyns S, Nelles L, Auwerx J, Ny T, Collen D. Interaction of AP-1, AP-2 and SP-1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulation region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response. *J Bio Chem*, 1992, **267** (21): 15086-091

(此文编辑 文玉珊)